

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

cited in the European Search
Report of EP 99 286 50.7
Your Ref.: DIVER 1150 EP

PUBLICATION NUMBER : 02276578
PUBLICATION DATE : 13-11-90

APPLICATION DATE : 29-03-89
APPLICATION NUMBER : 01077345

APPLICANT : SHOKUJIN SANGYO KOUSO KINOU
HENKAN GIJUTSU KENKYU KUMIAI;

INVENTOR : KURIKI TAKASHI;

INT.CL. : C12N 15/56 C12N 9/44

TITLE : NEOPULLULANASE GENE,
RECOMBINANT VECTOR CONTAINING
SAME AND NEOPULLULANASE
THEREFROM

```

10      20      30      40      50
ATGAGGAGAG AAGGCAATGA AGAGGAGAG GGTGAGAGT TGGGATGCG
60      70      80      90      100
GTATGAGAT GAGGAGATG AGCTTGGGCT TGGAGAGAA AAGAGCGATA
110     120     130     140     150
TGGATGAGT TGGGCTGCTG CATGATGAGC GGTATGAGT GGAAGATGGA
160     170     180     190     200
GCTTGGGCTG TGGAGATGAT GGGGATGGA AAGAGAGAA GTGAGAGCTT
210     220     230     240     250
GCTTGGATAT TGGTGGGCTG AAGTCAAGC TGGATGAGC GGGTACGCT
260     270     280     290     300
AGGGGTTCTT GGTGATGGA GAGAGAGGAG AGCTGCTTTA TACAGAGAAA
310     320     330     340     350
GGGTTTACT TGGAGCTTGG AAGGATGAT AGGGTACTT ACTTTTCTT
360     370     380     390     400
TGGTTTCTT CATGAGTGG AGTTGCTGA GGGGGGAG TGGTAAGC
410     420     430     440     450
ATGAGGCTG GTATCAAGT TGGGCTGAG GGTGAGGAG GAGAGAGCA
460     470     480     490     500
TGAATGATG GAGAGAGAT GGGGCTGAG GAGAGAGAG ATGAGAGAG
510     520     530     540     550
AAGGTTTCTT TGGGATGAT TGGGCTTCTT TGGGCTTCTT TGGGCTTCTT
560     570     580     590     600
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
610     620     630     640     650
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
660     670     680     690     700
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
710     720     730     740     750
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
760     770     780     790     800
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
810     820     830     840     850
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
860     870     880     890     900
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
910     920     930     940     950
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT
960     970     980     990     1000
AAGTACAGAT GGGGATGAT TGGGAGATG GGGGATGAT TGGGATGAT

```

ABSTRACT : PURPOSE: To provide the title gene capable of mass production of neopullulanase in an appropriate host, having a base sequence of a specific formula or a base sequence virtually equivalent thereto.

CONSTITUTION: The objective gene of formula I. Also the other objective recombinant vector containing said gene or gene virtually equivalent thereto. As a material for said gene, pPP10(Japanese patent application number 82-330625, etc.) developed by the present inventors was used. The plasmid pPP10 is incorporated with the neopullulanase gene of Bacillus stearothermophilus TRS40 strain origin, being made by a technique similar to those described in the above specifications or the literatures. For the determination of the DNA base sequence, the plasmid pPP10 is fragmented using a variety of restriction enzymes and incorporated into plasmid pUC118/119 followed by preparing single- stranded DNA using helper phage M13K07 and then applying the dideoxy method..

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-276578

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 15/56
9/44

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7823-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)11月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ネオブラナーゼ遺伝子、それを含有する組換えベクター並びにネオブラナーゼ

⑯ 特 願 平1-77345

⑰ 出 願 平1(1989)3月29日

⑱ 発 明 者 岡 田 茂 孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269

⑲ 発 明 者 今 中 忠 行 大阪府吹田市山田西3-33 A-205

⑳ 発 明 者 栗 木 隆 大阪府吹田市五月ガ丘東8番 A-403

㉑ 出 願 人 食品産業酵素機能変換 東京都中央区日本橋小伝馬町17番17号 峰澤金物ビル4階
技術研究組合

明 細 書

式1;

1. 発明の名称

ネオブラナーゼ遺伝子、それを含有する組換えベクター並びにネオブラナーゼ

2. 特許請求の範囲

1) 下記の式1で表される塩基配列またはそれと実質的に同等な塩基配列を有するネオブラナーゼ遺伝子。

2) 下記の式1で表されるネオブラナーゼ遺伝子またはそれと実質的に同等な遺伝子を含有する組換えベクター。

3) 下記の式2で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するネオブラナーゼ。

```
ATGAGCAAG 10 20 30 40 50  
AMCCATCTA CCACCCCGG GCTGACACT TCGCTATGC  
60 70 80 90 100  
CTATCATGT GAGACACTTC ATCTTGGCT TCGACAAAA AAGACATTA  
110 120 130 140 150  
TCGATCGGT TGAAGTGTG CATGGTGAC CGTATGACT GCAAAATGA  
160 170 180 190 200  
GCTTGGCAGT TTCAATGAT GCCGATCGA AAACAGGAA GTGACAGCT  
210 220 230 240 250  
GTTGATTAAT TCGTTCGCC AAGTCAAAC TCCCTATCG CGGTACGCT  
260 270 280 290 300  
ACGGTTTCT GCTGTATTCA GCGAGGAGA AGCTGTTTA TACAGMAAA  
310 320 330 340 350  
GGGTTTACT TTGAGCTTC AACCATGAT ACGGCTTACT ACTTTGCTT  
360 370 380 390 400  
TCCCTTCTT CATCGAGTCG ACTTGTTCG GCGCCCGGAT TCGGTAAAG  
410 420 430 440 450  
ATACAGCTG GTATCAAAAT TTCCCTGAGC GGTTCGCCA CCGAACCCA  
460 470 480 490 500  
TCAATCAGT CAGAAAGATC GCGCCCGTGG GCGAGCCAGC ATCCAAACG
```

510 520 530 540 550
 AACCAATTIT TTGGGGGG ACTTGAAGG GATTATCGAT CATCTCGATT
 560 570 580 590 600
 ACCTTCTGA CCTCGTATT ACCGGTATT ACTTAAGCC GATCTTCCGT
 610 620 630 640 650
 TCTCCGTCAA ACCATAAATA CGATACCGCT GATTATTITG AAGTCGATCC
 660 670 680 690 700
 ACACITTTGG GATAAGAAA CGTTGAAGAC CCTCATCGAC GGTTCGCATG
 710 720 730 740 750
 AAAAAAGTAT CCGCGTTATG CTCGATGGCG TGTTAAACCA TTGGGGCTAT
 760 770 780 790 800
 GAGTTCCGCC CGTTCCAAGA TGTATGAAA AATGGTGAGT CCTCAAAATA
 810 820 830 840 850
 TAAGGACTGG TTTCACATTC ATGAATTTC CCTGCAAAACA GAGCCCGCGC
 860 870 880 890 900
 CGAATTACGA TACATTTTCCA TTGCTGCCAC AATGCCAAA GCTGAACACC
 910 920 930 940 950
 GCCAATCCAG AAGTGAAGCG TTAATTGCTT GATTTTCCGA CATATTGGAT
 960 970 980 990 1000
 TCCTGAGTTT GACATTGACG GTTGGCGGCT TGATGTTGCC AATGAAATCG

1010 1020 1030 1040 1050
 ACCACGAATT TTGGCGCGAG TTCCCGCAGG AGGTAAAGCC ACTGAACCCG
 1060 1070 1080 1090 1100
 GAGGTATACA TCCTCGGGGA AATTGGGAT GATCGGATGC CGTGGCTGCG
 1110 1120 1130 1140 1150
 CGGTGACCAG TTGACGCGAG TCATGAACCTA CCGCTTTACA GACGGGGTGC
 1160 1170 1180 1190 1200
 TCGGCTTTT CGCCAAGGAA GAGATTAGTG CACGCCAGTT TGCTAATCAA
 1210 1220 1230 1240 1250
 ATGATGTCATG TACTTCTATC GTATCCGAAC AATGTCGAAC AGCGCGGCATT
 1260 1270 1280 1290 1300
 CAATTTCCTC GGCAGTCATG ATACATCAAG AATTCCTACC GTTTCGCGCG
 1310 1320 1330 1340 1350
 CGCATATCCG CAAGCTGAAG TTGTTATTTT TGTTTCAACT GACCTTTCACG
 1360 1370 1380 1390 1400
 GGTTCACCAT GCATTTACTA TGGGATGAA ATCGGCATGA CCGGGGCGAAA
 1410 1420 1430 1440 1450
 CGATCCCGAG TCCCGGAAGT GCATGCTGTG GGATCCGATG CAACAAACA
 1460 1470 1480 1490 1500
 AAGAGCTGCA CCAACACGTC AAGCAGCTGA TAGCGCTGCG CAACACGAT

A I;

1510 1520 1530 1540 1550
 CGCTCACTAC GCCCGCGGGA AATCTCTTTT CTTTCATGCCG ATGATGAAT
 1560 1570 1580 1590 1600
 GAACTATCTT ATTTACAAA AATCAGATCG AGATGAACG GTGTTAGTCA
 1610 1620 1630 1640 1650
 TCATCAATCG GAGCGACCA AAGCCGACA TCCCGATCCC GCTCATGCA
 1660 1670 1680 1690 1700
 AGAGCAACAT GGCTCGTTAA CCTCTTGACT GCGGACCGT TTGACAGCGA
 1710 1720 1730 1740 1750
 GCCACAAACG CTTTGCACCT CTTACCGCC CTATGGGTTT GTACTTTATG
 1760
 CAATAGAACCA TTGGTAG

MetLeuGlySerGluValIleIleTyrHisValSerPheValIleTyrValAspSer
 10
 GluThrLeuHisIleValAspLeuArgThrIleValAspAspIleAspArgValGluLeuLeu
 30
 HisGlyAspProTyrAspTrpGlnAsnGlyValIleTrpIlePheGlnMetPheMetArg
 50
 LysThrGlySerAspGluLeuPheAspTyrTrpPheAlaGluValLysProTyrArg
 70
 ArgLeuArgTyrGlyPheValLeuTyrSerGlyGluIleLysLeuValTyrThrGluLys
 90
 GlyPheTyrPheGluValProThrAspAspThrAlaTyrTyrPheCysPheProPheLeu
 110
 HisArgValAspLeuPheGluValAspProValLysAspThrValTrpTrpGlnIle
 130
 PheProGluValArgPheAlaValAsnGlyAsnProSerIleSerProGluLysSerArgProTrp
 150
 GlySerGluAspProThrProThrSerPhePheGlyGlyAspLeuGlnIleIleIleAsp
 170
 HisLeuAspTyrLeuLeuValAspLeuGlyIleThrIleTyrLeuThrProIlePheArg
 190
 200

210 220
 SerProSerAsnHisLysTyrAspThrAlaAspTyrTheGluValAsnProHisIleGly
 230 240
 AspLysGluThrLeuLysThrLeuIleAspArgCysHisGluLysGlyIleArgValMet
 250 260
 LeuAspAlaValPheAsnHisCysGlyTyrGluPheAlaProPheGlnAspValTrpLys
 270 280
 AsnGlyGluSerSerLysTyrLysAspTrpPheHisIleHisGluPheProLeuGlnThr
 290 300
 GluProArgProAsnTyrAspThrPheArgPheValProGlnMetProLysLeuAsnThr
 310 320
 AlaAsnProGluValLysArgTyrLeuLeuAspValAlaThrTyrTrpIleArgGluPhe
 330 340
 AspIleAspGlyTrpArgLeuAspValAlaAsnGluIleAspHisGluPheTrpArgGlu
 350 360
 PheArgGlnGluValLysAlaLeuLysProAspValTyrIleLeuGlyGluIleTrpHis
 370 380
 AspAlaMetProTrpLeuArgGlyAspGlnPheAspAlaValMetAsnTyrPropheThr
 390 400
 AspGlyValLeuArgPheAlaGlyGluGluIleSerAlaArgGlnPheAlaAsnGln
 410 420
 MetMetHisValLeuHisSerTyrProAsnAsnValAsnGluAlaAlaPheAsnLeuLeu
 430 440
 GlySerHisAspThrSerArgIleLeuThrValCysGlyGlyAspIleArgLysValLys
 450 460
 LeuLeuPheLeuPheGlnLeuThrPheThrGlySerProCysIleTyrTyrGlyAspGlu
 470 480
 IleGlyMetThrGlyGlyAsnAspProGluCysArgLysCysMetValTrpAspProMet
 490 500
 GlnGlnAsnLysGluLeuHisGlnHisValLysGlnLeuIleAlaLeuArgLysGlnTyr
 510 520
 ArgSerLeuArgArgGlyGluIleSerPheLeuHisAlaAspAspGluMetAsnTyrLeu
 530 540
 IleTyrLysLysThrAspGlyAspGluThrValLeuValIleIleAsnArgSerAspGln
 550 560
 LysAlaAspIleProIleProLeuAspAlaArgGlyThrTrpLeuValAsnLeuLeuThr
 570 580
 GlyGluArgPheAlaAlaGluAlaGluThrLeuCysThrSerLeuProProTyrGlyPhe
 ValLeuTyrAlaIleGluHisTrp

3. 発明の詳細な説明

1) 産業上の利用分野

本発明は、ネオブルラナーゼ遺伝子、それを含む有する組換えベクター並びにネオブルラナーゼに關し、その産業上への利用を計るものである。

2) 従来技術とその課題

ネオブルラナーゼは本発明者等によって発見され命名された新酵素であり、ブルランを加水分解し、主生成物としてパノースを生じるブルラナーゼ類似酵素である（特願昭62-330624号、又は *Journal of Bacteriology* 第1554頁（1988年））。

パノースは抗腐蝕性を示し、かつビフィズス菌の増殖因子であるなど有用な物質であるが、ネオブルラナーゼはブルランから高収率でこのパノースを生成するところから、本発明者等によってその応用研究が進められている。

またネオブルラナーゼの遺伝子を組込んだプラスミドにより形質転換された枯草菌も既に本発明者等により発明されているが（特願昭62-330625号）、当該酵素についての詳細な知見がないため、ネ

オブルラナーゼを大量に生産させるべき遺伝子工学的手段を講じることや蛋白質工学的手法による当該酵素自身の改良を行うことが困難であった。

3) 課題解決の手段

本発明者等は、これらの課題を解決すべくパチルス ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) IRS40株（微工研研受託 PERM P-9509）由来のネオブルラナーゼ遺伝子を含む2154塩基対のDNA断片の全塩基配列を決定し、ネオブルラナーゼ遺伝子の構造を明らかにすると共に、ネオブルラナーゼ蛋白の構造（アミノ酸配列）を明らかにし、本発明を完成するに至った。以下に、本発明の具体的な手段を実施例により説明する。

4) 実施例

A) ネオブルラナーゼ遺伝子の取得

ネオブルラナーゼ遺伝子の材料としては、本発明者等による pPP10（特願昭62-330625号、又は *Journal of Bacteriology*, 第170巻、第1554頁（1988））を用いた。本プラスミドには、前述の *Bacillus stearothermophilus* IRS40株由来のネ

オブストラナーゼ遺伝子が組込まれており、その作成方法については上記明細書又は特許文において述べたのと同様な手段によった。

B) DNA塩基配列の決定

プラスミド pPP10 を各種制限酵素を用いて分解し、プラスミド pUC118/119 に組込んだ後、ヘルパーファージ M13KO7 により一本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法で塩基配列を決定した (第 1 図)。決定された塩基配列は 2154 塩基対よりなり、ネオブルラナーゼ遺伝子 (ap1T) の全領域を含んでいる。第 1 図の塩基配列中には、110 番目の ATG から始まり 1874 番目の TAG で終わる 1764 塩基対のネオブルラナーゼに対応するオープンリーディングフレームが存在する。

ATC開始コドンの7塩基前にAAGGAGGAGAのリボソームバイディングサイトが存在する。プロモーター領域の-35、-10については、20番目にTTGACと43番目にTACTCTあるいは25番目にTTTTTと48番目にTTTAAATが見出される。また、オープンリーディングフレームに対応するペプチドのC末端から39塩基下流には転写におけるターミネーターとして機能

しうる逆方向反復配列がみとめられる。

C) アミノ酸配列 (式 II) 及びアミノ酸組成

決定されたネオブurlラナーゼ遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列からネオブurlラナーゼは588のアミノ酸残基からなる分子量89,144ダルトンの酵素であると考えられた。実際に精製したネオブurlラナーゼを用いてN末端アミノ酸配列を分析した結果、Met-Arg-Lys-Glu^U-Alaの配列となっており、塩基配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致した。

5) 発明の効果

本発明によりネオプルーナーゼを適当な宿主で大量生産することや蛋白質工学的的手法により酵素を改良することなどの手段が講じられることとなった。

4. 図面の簡単な説明

表 1 圖——填基配列圖

刊紙
第1回 第1

第1回々々

[illegible]

| | | | | |
|---------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| 510 | 520 | 530 | 540 | 550 |
| GGGTAAAGCATACAGTGTGTATCAATTTTCCCTGAGCGGTTCCGCAAC | | | | |
| 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| GGCAACCCATCAATCAAGTGGAGAGGAAATCCGCGCCGCTGGAGGACGAGCA | | | | |
| TCACACACCAACCAAGTTTATTTTGGCGGGAGCTTCGCAAGCGAATTATCATC | | | | |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| ATCTCATTTACCTGTTTGAACCTGTGATATACCGGTATTTACCTTACGCGCG | | | | |
| 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |
| ATCTTCGGGTTCTCCGTCACAAACATAATACAGATACCGCTGATTTATTTTGA | | | | |
| 710 | 720 | 730 | 740 | 750 |
| AGTCGATTCACACTTTGGGATTAAGCAACGTTGAAMACGCTCATCGACCC | | | | |
| 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| 810 | 820 | 830 | 840 | 850 |
| GTTCGCATTAAGAAAGTAATCCCGGTTATTCGCAATCCCGTTTAAACAT | | | | |
| 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| TGCGGCTATGAGTTCGCCCGCTTCGCAAGATATATCGAAAAATCGTAGTTC | | | | |
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 |
| CTCAAAATTTAAGCATGTGGTTTACATTTCAATTCAATTTTCCGCTGCAACACAG | | | | |
| 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| AGGCGACAGCGCAATTACAGATCAATTTTCGATTTCTGTGCAAGAAATCCCAAG | | | | |

特開平2-276578(6)

5. 補正の対象
図面

6. 補正の内容
別紙のとおりに図面を補正する

7. 添付書類の目録
図面の第1図の1から第1図の5まで

各1通